Uscn Life Science Inc. Wuhan

网址: www.uscnk.com
电话: +86 27 84259552
传真: +86 27 84259551
E-mail: uscnk@uscnk.com

小鼠窖蛋白(Cav1)酶联免疫吸附测定试剂盒使用说明书

产品编号：E0214Mu
规格：96T
本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!

预期应用

本酶联免疫吸附测定试剂盒运用双抗体夹心 ELISA 法定量测定小鼠血清、血浆或其它相关生物液体中 Cav-1 含量。

本试剂盒已提供的试剂

试剂名称	数量
96 孔板(预包被)	1
标准品 (冻干)	2
标准品稀释液	1 × 20ml
检测溶液 A	1 × 120μl
检测溶液 B	1 × 120μl
检测稀释液 A(2 x)	1 × 6ml
检测稀释液 B(2 x)	1 × 6ml
TMB 底物	1 × 9ml
终止液	1 × 6ml
浓洗涤液(30 x)	1 × 20ml
96 孔板覆膜	4
使用说明书	1

本试剂盒未提供但需自备的设备及试剂

1、450±10nm 滤光片的酶标仪（建议仪器使用前提前预热）
2、单道和多道微量加液器及吸头
3、稀释样品的 EP 管
4、蒸馏水或去离子水
5、吸水纸
6、盛放洗液的容器

试剂盒的储存及有效期

所有试剂均按试剂瓶标签上所示保存。请注意，收到试剂盒后请尽快将标准品、检

测溶液 A、检测溶液 B 以及 96 孔板保存于-20℃。开封后的酶标板要密封加干燥剂后保存于-20℃，避免潮湿。有效期为 6 个月。

实验原理

将 Cav-1 抗体包被于 96 孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中依次加入标准品和标本，其中的 Cav-1 与连接于固相载体上的抗体结合，洗板之后加入生物素化的 Cav-1 抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入 HRP 标记的亲和素，再次彻底洗涤后加入底物(TMB)显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 Cav-1 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（O.D.值），计算样品浓度。

标本的采集与保存

1、 血清：将收集于血清分离管的全血标本在室温放置 30 分钟或 4℃过夜，然后 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

2、 血浆：用 EDTA 或肝素作为抗凝剂采集标本，并将标本在采集后的 30 分钟内于 2 - 8℃ 1000×g 离心 15 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

3、 其它生物标本：请 1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

注意：

1、 以上标本均需密封保存，4℃保存应小于 1 周，-20℃不应超过 1 个月，-80℃不应超过 2 个月。

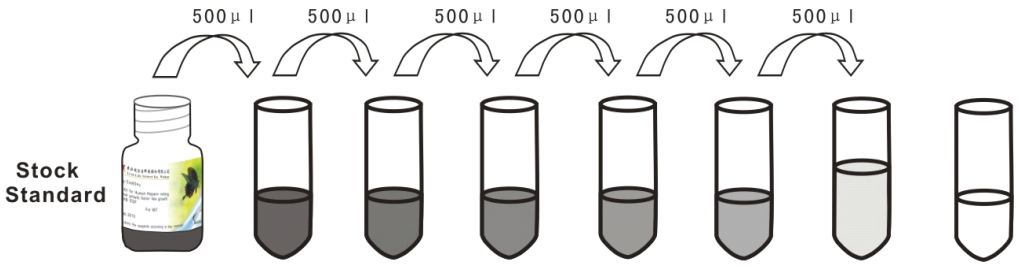
2、 标本使用前应缓慢均衡至室温，不应加热使之融解。

3、 标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

试剂准备

1、 使用前将所有的试剂和标本缓慢均衡至室温(18-25℃)，试剂不能直接在 37℃溶解。

2、 **标准品**（冻干品）：每瓶标准品用**标准品稀释液**稀释至 1mL，盖好后室温静置大约 10 分钟，同时反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 2,000 pg/mL。准备 7 个稀释标准品的 EP 管，每个 EP 管中加入 500μl的**标准品稀释液**，如图所示依次倍比稀释成 2,000 pg/mL，1,000 pg/mL，500 pg/mL，250 pg/mL，125 pg/mL，62.5 pg/mL，31.2 pg/mL，标准品稀释液（0 pg/mL)直接作为空白孔。**为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。**



Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
pg/mL	2,000	1,000	500	250	125	62.5	31.2	0

3、 **检测稀释液 A 及检测稀释液 B**：用 6mL 蒸馏水或去离子水将 6mL 浓检测液 A 及 B 稀释至 12mL，进行 2 倍稀释，稀释后的工作液不宜进行冷冻保存。

4、 **检测溶液 A 及检测溶液 B**：Detection A 及 Detection B 在使用前请手甩几下或少时离心处理，以使管壁或瓶盖的液体沉积到管底。临用前分别以**检测稀释液 A 或 B** 1:100 稀释（如：10 μl检测溶液 A / 990μl检测稀释液 A），充分混匀，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（100μl/孔），实际配制时应多配制 0.1-0.2mL。

5、 **浓洗涤液**：用 580mL 蒸馏水或去离子水将 20mL 浓洗涤液稀释至 600mL，进行 30 倍稀释。

6、 **底物溶液**：请用灭菌的移液器吸头吸取所需体积的 TMB 至另一干净容器中使用，容器中剩余的底物应予丢弃，不要倒回 TMB 瓶中。

注意：

1、 **标准品**请于临用前 15 分钟内配制。**该标准品只能使用一次。**

2、 标准品的稀释不能直接在板中进行。

3、 **标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液**请使用相应的稀释液配制，不能混淆。混匀时要轻轻充分混匀，避免起泡。为保证实验结果的准确请使用微量吸管，并校准微量加液器。请依据所需的量精确配制，尽量不要微量配制（如吸取**检测溶液 A** 时，一次不要小于 10μl），以避免造成浓度误差。

4、 请勿重复使用已经稀释过的**标准品、检测溶液 A 工作液**和**检测溶液 B 工作液**。

5、 **浓洗涤液**中如有结晶析出，请先温育至室温，轻轻混匀，至到结晶完全溶解再进行配制。

操作步骤

实验前应预测标本含量，如果标本浓度过高，应对标本进行稀释，使稀释后的标本符合试剂盒的检测范围，计算时再乘以相应的稀释倍数。

1、 加样：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔 7 孔，依次加入 100 μl 不同浓度的标准品（见试剂准备 2）。空白孔加 100 μl（见试剂准备第二步最后一管），余孔加待测样品 100μl，酶标板加上覆膜，37℃温育 2 小时。

2、 弃去液体，甩干，不用洗涤。

3、 每孔加**检测溶液 A 工作液** 100μl（临用前配制），酶标板加上覆膜，37℃温育 1 小时 。

4、 弃去孔内液体，每孔用 400μl 的洗涤液洗涤，浸泡 1-2 分钟，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干），重复洗板 3 次。最后一次洗涤后，要把孔内的洗涤液完全甩干。

5、 每孔加**检测溶液 B 工作液**（临用前配制）100μl，加上覆膜，37℃温育 30 分钟。

6、 弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，方法同步骤 4。

7、 每孔加**底物溶液** 90μl，酶标板加上覆膜，37℃**避光显色**（反应时间控制在 15-25 分钟，不要超过 30 分钟。当标准孔的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色，后 3-4 孔梯度不明显时，即可终止）。

8、 每孔加**终止溶液** 50μl，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一，请轻轻晃动 酶标板以使溶液混合均匀。

9、 在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后，立即用酶标仪在 450nm 波长测量各孔的光密度（O.D.值）。

注意：

1、 **试剂准备**：准备一次实验所需要的酶标条，其它的可从微孔板上拆下，密封，按照说

明书要求保存，以备下次使用。

2、 **加样：**实验操作中请使用一次性的吸头，避免交叉污染。加样时注意不要有气泡，将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。加样或加试剂时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的“预温育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。因此，一次加样时间（包括标准品及所有样品）最好控制在 10 分钟内。推荐设置复孔进行实验。

3、 **温育：**为防止样品蒸发，实验时请将加上盖或覆膜的酶标板置于湿盒内，以避免液体蒸发，洗板后应尽快进行下步操作，任何时侯都应避免酶标板处于干燥状态，同时应严格遵守给定的温育时间和温度。

4、 **洗涤**：充分的洗涤非常重要，在每次洗涤过程中，都要将洗涤液完全甩干。洗涤过程中反应孔中残留的洗涤液应在滤纸上拍干，勿将滤纸直接放入反应孔中吸水，同时要消除板底残留的液体和手指印，避免影响最后的酶标仪读数。

5、 **反应时间的控制：**加入底物后请定时观察反应孔的颜色变化（比如，每隔 10 分钟观察一次），如颜色较深，请提前加入终止液终止反应，避免反应过强从而影响酶标仪光密度读数。

6、 **底物：**底物请避光保存，在储存和温育时避免强光直接照射。

洗板方法

1、 手工洗板方法：将推荐的洗涤缓冲液至少 0.4mL 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体，在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；根据需要，重复此过程数次。

2、 自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

计算

各标准品及样本 O.D. 值扣除空白孔 O.D. 值后作图（七点图），如设置复孔，则应取其平均值计算。以标准品的浓度为纵坐标（对数坐标），O.D.值为横坐标（对数坐标），在对数坐标纸上绘出标准曲线（最佳方程式应依回归方程计算的 R^2 值来定，以 R^2 值越趋近于 1 为好）。推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3，根据样品O.D.值，由标准曲线查出相应的浓度，乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 O.D.值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 O.D.值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

检测范围：31.2 pg/mL - 2,000 pg/mL

最低检测限：6.9 pg/mL

此值为 20 个空白样品（即标准品稀释液）测定的平均值加三倍标准差所对应的浓度 。

特异性

本试剂盒用于检测小鼠 Cav-1，灵敏度高，特异性好，且与其它相关蛋白无明显交叉反应。

说明

1、 由于现有条件及科学技术水平尚不能对所有供货商提供的所有原料进行全面的鉴定与分析，本产品可能存在一定的质量技术风险。

2、 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及当时的实验环境密切相关，请务必准备充足的标本备份。
3、 本试剂盒不能排除标本中可能含有的可溶性受体，配体，结合蛋白和其它相关因子对实验所产生的干扰。
4、 只有全部使用本试剂盒配套试剂才能保证检测效果，因为所有试剂都是有关联的，不能混用其他制造商的产品。只有严格遵守本试剂盒的实验说明才会得到最佳的检测结果。
5、 在储存及温育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。
6、 刚开启的酶联板孔中可能会有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。请勿提前将酶标板从包装袋里拿出。
7、 本试剂盒有效期：六个月。
8、 请使用配备有 450±10nm 滤光片的酶标仪，且该酶标仪测量范围在 0.001-3.000 O.D.或以上。
9、 本操作说明同样适用于 48T 试剂盒，但 48T 试剂盒所有试剂减半。

警告

本试剂盒中使用硫酸作为终止液，其具有轻微腐蚀性，使用时应避免接触衣物或眼、手等皮肤暴露部位。

【售后服务】

电　　话：027-84259508
传　　真：027-84259458
电子邮箱：tech@uscnk.com